

## 골수유래 간엽줄기세포의 조건배지가 Ntera-2 인간신경세포의 신경돌기 성장에 미치는 영향

오진수<sup>1,2</sup> · Meng Lu Liu<sup>1,2</sup> · Hong Lian Jin<sup>1</sup> · 안성수<sup>1,2</sup> · 김궁년<sup>1</sup> · 윤도흠<sup>1,2</sup> · 하윤<sup>1</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 의과대학 신경외과, <sup>2</sup>연세대학교 의과학사업단 Brain Korea 21

### Effect of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media for Neurite Outgrowth in Human Ntera-2 Neurons

Jin Soo Oh,<sup>1,2</sup> Meng Lu Liu,<sup>1,2</sup> Hong Lian Jin,<sup>1</sup> Sung Su An,<sup>1,2</sup> Keung Nyun Kim,<sup>1</sup> Do Heum Yoon<sup>1,2</sup> and Yoon Ha<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Dept Neurosurgery, Spine & Spinal Cord Institute, College of Medicine, <sup>2</sup>Brain Korea 21 Project for Medical Sci, College of Medicine, Yonsei Univ, Shinchon-dong, Seodaemon-ku, Seoul 120-750 Korea,

(Received: March 5<sup>th</sup>, 2009; Accepted: March 15<sup>th</sup>, 2009)

**Abstract :** Bone marrow derived mesenchymal stem cell(BMSC) based cell therapy can promote functional recovery and regeneration in central nervous system(CNS) disease models. These beneficial effects have been primarily attributed to the differentiation potential into varieties of cell lineages and the therapeutic paracrine factors secreted by BMSC after transplantation. Many secreted factors from BMSC have been identified recently in the conditioned media. However, the effects of these factors on the neuronal regeneration need further verification with relevant neuronal models. Ntera-2 neurons have been used for the therapy of several different CNS diseases in animal models. Recently some clinical trials have confirmed the safety and potential efficacy of Ntera-2 neurons for stroke therapy. In this study, the Ntera-2 neuron model was used to directly verify the effect of BMSC conditioned media(BMSC-CM) on neurite outgrowth *in vitro*. Our study confirmed that the BMSC-CM could increase both the neurite length and branch number of Ntera-2 neurons, compared to the control group with non-conditioning media. Since the BMSC can secrete many therapeutic factors into the conditioned media, our data support the theory that BMSC promote neurite outgrowth through secreting paracrine factors.

**Key words:** Mesenchymal stem cell-conditioned media(MSC-CM), neurite outgrowth, Ntera-2 neuron

## 1. 서 론

중추신경 질환을 치료하기 위한 세포치료기술에 대한 관심이 점차 늘어남에 따라 배아줄기세포, 신경줄기세포, 골수유래 간엽줄기세포, 지방유래 간엽줄기세포, 재대혈유래 간엽줄기세포, 역분화 세포 등등이 활발히 연구 진행 중이다.<sup>1,4</sup> 특히 위의 줄기세포들 중에서도 간엽줄기세포는 자가 이식이 가능하다는 이점이 있어 임상단계에 더욱더 가까이 다가왔다.<sup>5</sup> 골수유래 간엽줄기세포가 손상된 조직의 치료를 향상시킨다는 연구가 이루어져 왔고,<sup>6</sup> 골수유래 간엽줄기세포를 이용한 세포이식은 손상 받은 심장과 뇌의 회복을 향상 시

켰다.<sup>7,8</sup> 간엽줄기세포의 이식은 척수손상 동물모델의 기능 회복을 향상시켰고<sup>9,10</sup>, 손상부위의 수초재생을 촉진하고 축삭전도를 향상시키며<sup>11</sup>, 손상부위의 신경재생과 줄기세포의 증식, 신경세포의 생존을 향상 시키는 신경보호인자를 생산할 수 있다고 발표되었다.<sup>12,13</sup> 간엽줄기세포에서 성장인자와 사이토카인을 분비하고 척수손상 동물모델에서 운동기능을 향상시킨다는 보고와 함께<sup>13,14</sup> 지금까지 많은 연구자들이 간엽줄기세포에서 분비되는 성장인자의 종류를 분석하여<sup>2,15</sup> 신경재생과 보호 효과와 관련 되어있는 인자들을 찾기 위해 노력하고 있다.<sup>13,16-20</sup>

골수유래 간엽줄기세포는 조혈줄기세포의 분화와 증식, 생존을 촉진하는 에리스로포이에틴과 호산구 콜로니자극인자(G-CSF)와 같은 인자를 분비한다고 알려져 왔고, 이런 인자들의 다수는 비조혈조직의 재생과 회복을 향상 시켰다

\*Tel: 02-2228-2808; Fax: 02-393-9979  
e-mail: hayoon@yuhs.ac (Yoon Ha)

는 보고가 있으며<sup>21,22</sup>, 섬유아세포의 조건배지와 골수유래 간엽줄기세포의 조건배지 비교실험에서 간엽줄기세포의 조건배지는 상처 치료를 촉진하는 성장 인자를 많이 분비한다고 말했다.<sup>6</sup> 실제로 간엽줄기세포에서 분비된다고 알려져 있는 대표적인 성장 인자는 인터류킨류, FGF류, 혈소판유래 성장인자(PDGF), 혈관내피세포성장인자(VEGF), 간세포 성장인자(HGF), 전환성장인자(TGF), 종양괴사인자(TNF- $\alpha$ ), TIMP-1, TIMP-2, IGF, BDNF, PIGF, MIP-1, SCF, GM-CSF, NGF<sup>19,23</sup> 등이다.

Ntera-2 세포는 인간 테라토종양세포로서 레티노인산을 일정 기간 동안 처리하면 신경세포로 분화한다는 보고가 있으며 중추신경계 질환을 치료하기 위한 가능성을 보여주고 있다.<sup>24-33</sup>

본 연구는 골수유래 간엽줄기세포에서 분비하는 여러 성장인자와 싸이토카인이 신경세포의 신경돌기 성장을 증가시킬 수 있다는 가설을 바탕으로 진행하였고, 골수유래 간엽줄기세포를 하루 동안 배양한 후에 얻은 조건배지만을 이용하여 Ntera-2 신경세포의 신경돌기 성장에 미치는 효과를 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 골수유래 간엽줄기세포의 배양

환자의 골수혈액과 Hanks' balance salt solution(HBSS, GIPCO) 수용액과 1:1비율로 혼합한 골수 혈액을 Ficoll (Amersham Bioscience)위에 조심스럽게 중층하고 800 g 에서 30 분 동안 원심분리 하면 단핵층을 볼 수 있다. 이 층을 파이펫으로 흡입하여 다른 튜브에 옮기고 2000 rpm 에서 7 분 동안 원심분리 하였다. 펠렛을 인산완충용액(PBS, 10 $\times$ , GIPCO)으로 씻어내고 다시 2000 rpm에서 7 분 동안 원심분리 하여 최종적으로 펠렛을 얻고, 10% 우태아혈청(FBS, Hyclone)과 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S, 100 unit/mL, Invitrogen, UK) 항생제가 포함되어 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GIBCO)배지 5 mL을 펠렛과 함께 T25 플라스크(Nunc)에 배양하여 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 2 일 후에 동일한 배지 5 mL을 추가하였고, 간엽줄기세포가 바닥에 붙어 증식하고 있는 것을 확인하면 새로운 배지로 갈아주었다. 또한 골수혈액으로부터 얻은 세포가 간엽줄기세포가 갖는 특징을 나타내는지 확인하기 위하여 표지항원 CD90(1:500, Chemicon), CD105(1:500, Chemicon)를 사용하여 FACS를 수행하였다.

### 2.2 Ntera-2 세포의 배양 방법과 신경세포로의 분화

본 실험에 사용한 신경세포는 다음과 같은 방법을 사용하여 분화 시켰다. 인간테라토암세포주인 Ntera-2(ATCC,

Ntera-2 cl-D1)는 레티노인산(RA, 50mg, Sigma)을 4주간 처리하면 신경세포로 분화를 일으킨다는 보고가 이미 발표되었다.<sup>27</sup> 방법을 간단히 요약하자면, 먼저 2 $\times$ 10<sup>6</sup>개의 NT-2을 10% FBS와 1% P/S항생제 그리고 10  $\mu$ M의 RA를 포함하는 DMEM 배지로 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 배지는 초기 일주일만 매일 갈아주었고, 그 이후에는 2~3 일에 한 번씩 갈아주었다. 4 주 후에 0.25% 트립신/2 mM EDTA(Invitrogen, UK)를 이용하여 세포를 수확한 후, 새로운 플라스크에 1:6의 저밀도로 NT-2를 2일간 배양하였다(첫 번째 계대배양; replat #1). 2 일 후에, 0.25% 트립신/2mM EDTA를 짧은 시간 동안 처리하여 신경세포로 분화한 NT-2N만을 수확한 후 폴리-D-라이신(10  $\mu$ g/mL, Sigma)과 라미닌(10  $\mu$ g/mL, Sigma)으로 코팅된 플라스크위에서 배양을 하였다(두 번째 계대배양; replat #2). 10% FBS와 1% P/S 항생제 그리고 유사분열억제제인 1  $\mu$ M 시토신아라비노사이드(Sigma), 10  $\mu$ M 볼소데옥시유리딘(Sigma), 10  $\mu$ M 유리딘(sigma)을 포함하는 DMEM 배지로 약 3 주 정도 배양하면서 배지는 일주일에 두 번 갈아주었다. 이때 시토신아라비노사이드(Sigma)는 첫 번째 주에만 첨가 해주었고 그 이후에는 처리 하지 않았다. 두 번째 계대배양 이후 초기 단계에서는 단일뉴런을 형성하지만 약 3 주 정도 지나면 신경구가 형성하는 것을 관찰하였다.

### 2.3 간엽줄기세포의 조건배지

골수유래 간엽줄기세포 2 $\times$ 10<sup>5</sup>개를 10% FBS와 1% P/S를 포함하는 DMEM배지를 사용하여 37°C, 5%CO<sub>2</sub>를 유지하면서 배양하였다. 약 90% 정도 세포가 가득 차면 PBS를 이용하여 세포를 wash한 후 10% FBS를 포함하지 않는 배지로 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후에 배양된 간엽줄기세포의 배지를 조심스럽게 수거하여 원심분리하고 0.2  $\mu$ m 필터(Nalgene)로 불순물을 제거한 후 사용 하였으며, 남은 조건배지는 -20°C에서 저장하여 다음 실험에 사용하기 전까지 보관하였다. 서로 다른 농도의 조건배지(100%, 80%, 20%, 0%)를 간엽줄기세포의 조건배지와 FBS가 포함되지 않은 배지를 일정 비율로 섞어서 제조하였고, 이렇게 제조된 조건배지로 Ntera-2 신경세포에 배양하여 신경돌기의 길이와 수가 증가되는 것을 확인하였다.

### 2.4 면역형광염색법

Ntera-2 신경세포의 분화여부의 확인과 골수유래 간엽줄기세포의 조건 배지로 신경세포를 배양 후 나타나는 신경재생 효과를 측정하기 위해 면역 형광 염색을 수행 하였고, 사용된 항체는 다음과 같다. 토끼 anti-neurofilament(1:500, Chemicon), mouse anti-smi33(1:1000, Chemicon), mouse anti-GFAP(1:500, Chemicon), Cy3 conjugated anti-mouse(1:250,

**Table 1.** Secreted factors in the conditioned media of mesenchymal stem cells.

No.	Secreted factors	Abbreviation	Function
1	Interleukin family	IL	Immune system
2	Fibroblast growth factor	FGF	Neural induction, Wound healing
3	Platelet-derived growth factor	PDGF	Cell migration
4	Vascular endothelial growth factor	VEGF	Angiogenesis, Neurite outgrowth, Neuroprotection
5	Hepatocyte growth factor	HGF	Organ regeneration
6	Transforming growth factor- $\beta$	TGF- $\beta$	Cell differentiation
7	Tumor necrosis factor	TNF	Apoptosis
8	Insulin-like growth factor	IGF	Cell proliferation, Apoptosis inhibition
9	Brain-derived neurotrophic factor	BDNF	Neurogenesis, Neurite outgrowth
10	Nerve growth factor receptor	NGF	Neuronal survival, Neurite outgrowth

Jackson immuno research), FITC conjugated anti-rabbit(1:250, Jackson immuno research). 면역형광염색을 실시한 후에 형광 현미경(Image pro 4.5, Olympus)으로 사진을 저장하여 분화 여부를 확인하였고 신경돌기의 길이는 무작위로 설정한 영역에 나타나는 신경돌기 길이를 합산한 후 평균값을 구하였다(HCA-vision software).

## 2.5 간엽줄기세포 조건배지 분석

배양접시 안에 간엽줄기세포의 밀도가 90% 정도 되었을 때, 간엽줄기세포를 PBS로 완벽히 씻어낸 뒤 FBS가 첨가 되지 않은 배지로 온도 37°C, 이산화탄소 농도 5%에서 하루 동안 배양하였다. 다음날 조건배지를 조심스럽게 수거 하여 원심분리 한 후 0.2  $\mu$ m 필터(Nalgene)로 불순물을 제거하고 밀봉하여 프로테오믹스 분석을 의뢰하였고, 그 결과는 Table 1과 같다.

## 2.6 통계학적 분석

간엽줄기세포의 조건배지를 사용하여 신경세포를 배양한 그룹과 FBS를 포함하지 않은 배지로 신경세포를 배양한 두 그룹간의 신경돌기의 수와 길이를 비교 하였으며 통계학적 분석(T-test)을 수행하였다.

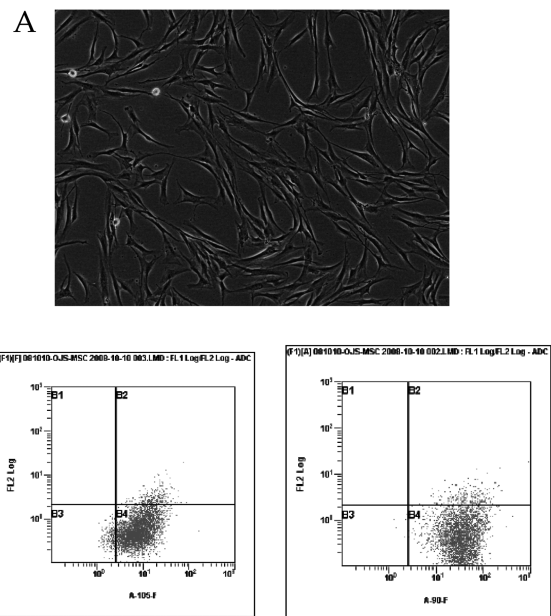
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 골수유래 간엽줄기세포의 표지항원

표지항원 CD90과 CD15를 사용한 FACS 분석 결과를 통해 골수혈액으로부터 1차 배양법으로 얻은 세포가 간엽줄기세포임을 확인하였다(Fig 1). 골수간엽줄기세포를 배양 후 제조한 조건배지는 신경세포로 분화된 Ntera-2세포를 배양하는 것에 사용되었다.

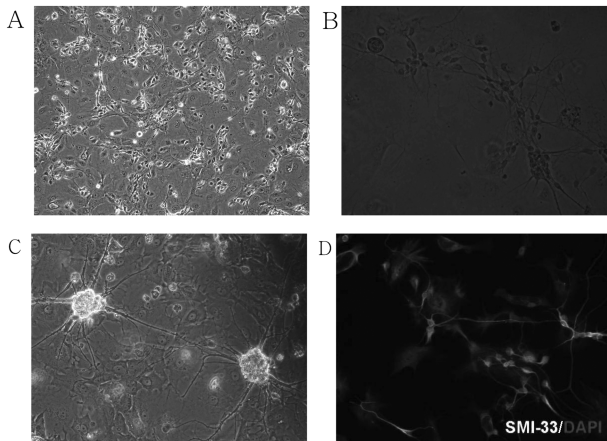
### 3.2 신경세포로 분화한 Ntera-2 세포

세포에 10  $\mu$ M 레티노인산을 4 주 동안 처리하여 두 차



**Figure 1.** Characterization of human mesenchymal stem cell(A) Phase contrast micrograph displayed a typical fibroblastoid morphology of plated MSC. The cells were photographed by phase microscopy at  $\times 100$  magnification. (B) Immunophenotype analysis of mesenchymal stem cells. Cells were trypsinized, labeled with CD 105, CD 90, and then analyzed by flow cytometry. Flow cytometric characterization of MSC revealed that cells expressed positively for MSC markers CD 105 and CD 90.

례의 계대배양(Replate #1,2) 후에 관찰한 Ntera-2 신경세포는 전형적인 신경세포의 특징을 보였다. 두 번째 계대배양(Replate #2) 후 4 일 뒤에는 각각 하나의 신경세포체와 짧고 적은 개수의 신경돌기를 보였지만(Fig 2-A), 배양 기간이 지날수록 신경세포의 수가 증가하여 신경구를 형성하고 신경돌기의 길이와 수가 증가되어 네트워크를 형성하였다(Fig 2-B). 약 3 주가량 지나면 신경세포의 증식이 증가하여 신경구의크기와개수가증가하는것을관찰할수있었다(Fig 2-C). 또한 Ntera-2세포가 신경세포 및 신경교세포



**Figure 2.** Neuronal morphology and immunocytochemistry of Ntera-2 neurons (A-C) Phase contrast photomicrographs showed neuronal morphological changes during differentiation of NT2 into neurons. (A) NT2 neurons grew on poly-D-lysine coated plates for 4 days following replate #2. (B) NT2 neurons began to aggregate at 11 days following replate #2. (C) NT2 neurons formed large aggregates at 19 days following replate #2. Images were obtained by phase microscopy at  $\times 100$  magnification. (D) Immunocytochemistry showed the expression of neuronal marker smi-33 in Ntera-2 neurons at about 11 days after replate #2. The cells were stained with anti-smi-33 antibody and FITC-conjugated secondary antibody. Images were obtained by fluorescence microscopy at  $\times 100$  magnification.

포로 분화 여부를 확인하기 위해 신경세포와 정상세포의 표지로 알려져 있는 mouse-anti GFAP(1:500, Chemicon), mouse anti-smi33(1:1000, Chemicon), rabbit anti-

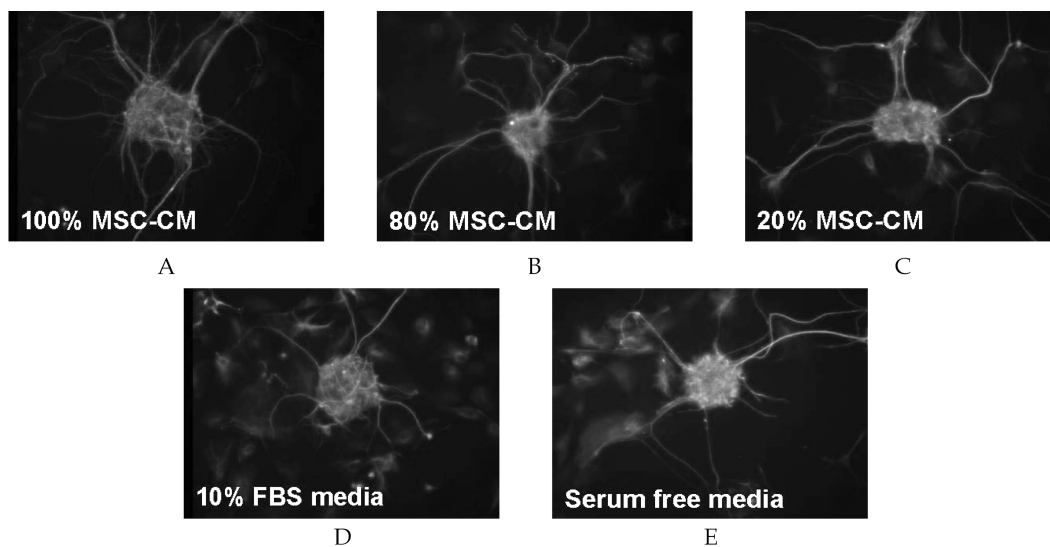
neurofilament (1:500, Chemicon)를 사용하여 면역형광염색법을 수행한 결과 신경으로 분화된 Ntera-2 신경세포는 anti-GFAP에는 발현하지 않은 반면, 신경세포의 표지인 mouse anti-smi33의 발현을 확인할 수 있었다(Fig 2-D).

### 3.3 간엽줄기세포의 조건배지를 이용한 Ntera-2 신경세포 배양

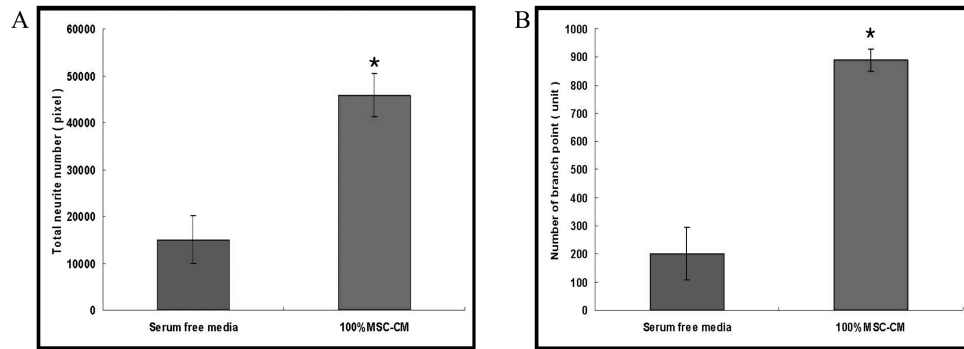
간엽줄기세포 조건배지에 포함되어 있는 분비물질을 분석하기 위해 프로테오믹스로 분석한 결과 조건배지는 인터류킨, FGF류, PDGF, VEGF, HGF, TGF, TNF- $\alpha$ , BDNF, NGF를 함유하고 있었다(Table 1). 간엽줄기세포의 조건배지에 함유되어 있는 많은 분비물질의 작용이 Ntera-2 신경세포의 신경돌기의 수와 길이를 향상시킬 수 있는 지 살펴보았다. FBS를 포함하지 않은 배지로 신경세포를 배양한 대조군과 비교하였을 때 100% 간엽줄기세포의 조건배지를 이용하여 신경세포를 배양한 그룹은 신경돌기의 수와 길이가 의미있게 증가하였고 통계학적 유의값을 보였다(Fig 3-4). 이는 하루 동안 간엽줄기세포가 분비한 물질을 담고 있는 간엽줄기세포의 조건배지가 신경세포의 신경돌기의 수와 길이를 향상시키는 인자를 함유하고 있다는 것을 나타낸다.

## 4. 결 론

간엽줄기세포에서 분비된 물질을 함유하고 있는 조건배지가 Ntera-2세포의 신경돌기 성장을 촉진시키는 효과를 확인 하였다. 간엽줄기세포의 조건배지만을 이용하여 배양한



**Figure 3.** Effect of mesenchymal stem cell conditioned media on neurite outgrowth of NT2 neurons MSC-CM treatment clearly increased neurite length in NT2 neurons cultures. NT2 neurons were cultured with media supplemented with 100% MSC-CM (A), 80% MSC-CM (B), 20% MSC-CM (C), 10% FBS (D) and serum free media (E). NT2 neurons were stained with rabbit anti-neurofilament antibody and examined by fluorescence microscopy. Images were obtained by fluorescence microscopy at  $\times 100$  magnification.



**Figure 4.** Quantification for neurite outgrowth of Ntera-2 neurons A treatment with 100% MSC-CM to NT2 neurons significantly improved the neurite outgrowth. Both the neurite length (A) and the number of branch point (B) were increased significantly by treatment with 100% MSC-CM, compare to treatment with serum free media. The neurite outgrowth and branch point number were measured by HCA-Vision software. \* $p < 0.05$  compare to treatment of serum free media.

Ntera-2 신경세포의 신경돌기의 수와 길이가 증가된 것은 간엽줄기세포에서 분비된 수많은 물질 중 신경 돌기성장을 촉진시키는 물질의 존재 가능성을 내포하는 것이므로 이에 결정적인 역할을 하는 새로운 인자를 찾기 위한 노력이 필요할 것으로 사료된다.

**감사의 글:** 본 연구는 세포융용사업단(SC-4180)의 연구 지원에 의하여 이루어 졌으므로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. S Kang, E Jun, Y Bae, J Jung, Interactions between human adipose stromal cells and mouse neural stem cells *in vitro*, *Develop Brain Res*, **145**, 141 (2003).
2. J Rehman, D Traktuev, J Li, *et al.*, Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells, *Circulation*, **109**, 1292 (2004).
3. J Munoz, B Stoutenger, A Robinson, *et al.*, Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice, *Proceed Nat'l Acad Sci*, **102**, 18171 (2005).
4. B Parekkadan, D van Poll, K Suganuma, *et al.*, Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure, *P Lo SONE*, **2** (2007).
5. K Kurozumi, K Nakamura, K Tamiyax, *et al.*, Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model, *Molecular Therapy*, **11**, 96 (2006).
6. L Chen, EE Tredget, PY Wu, *et al.*, Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing, *P Lo SONE*, **3**, e1886 (2008).
7. M Dominici, K le-Blanc, I Mueller, *et al.*, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, **8**, 315 (2006).
8. Y Li, J Chen, C Zhang, *et al.*, Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells, *Glia*, **49**, 407 (2005).
9. M Chopp, X Zhang, Y Li, *et al.*, Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation, *Neuro Report*, **11**, 3001 (2000).
10. C Hofstetter, E Schwarz, D Hess, *et al.*, Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery, *Proceed Nat'l Acad Sci*, **99**, 2199 (2002).
11. Y Akiyama, C Radtke, J Kocsis, Remyelination of the Rat Spinal Cord by Transplantation of Identified Bone Marrow Stromal Cells, *J Neurosci*, **22**, 6623 (2002).
12. Y Li, J Chen, X Chen, *et al.*, Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat Neurotrophins and functional recovery, *Neurology*, **59**, 514 (2002).
13. C Chen, Y Ou, S Liao, *et al.*, Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair, *Exper Neurology*, **204**, 443 (2007).
14. D Ankeny, D Mc Tigue, L Jakeman, Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats, *Exper Neurology*, **190**, 17 (2004).
15. FJ Rivera, S Couillard-Despres, X Pedre, *et al.*, Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells, *Stem Cells*, **24**, 2209 (2006).
16. K Jin, X Mao, D Greenberg, Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling, *J Neurobiology*, **66**, 236 (2006).
17. K Wright, WE Masri, A Osman, *et al.*, Bone marrow stromal cells stimulate neurite outgrowth over neural proteoglycans(CSPG), myelin associated glycoprotein and Nogo-A, *Biochem Biophys Res Comm*, **354**, 559 (2007).
18. A Banas, T Teratani, Y Yamamoto, *et al.*, IFATS collection: *In vivo* therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury, *Stem Cells*, **26**, 2705 (2008).
19. L Crigler, R Robey, A Asawachaicharn, *et al.*, Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis, *Exper Neurology*, **198**, 54 (2006).
20. A Khaibullina, J Rosenstein, J Krum, Vascular endothelial

- growth factor promotes neurite maturation in primary CNS neuronal cultures, *Developmental Brain Res*, **148**, 59 (2004).
21. M Galeano, D Altavilla, D Cucinotta, *et al.*, Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse, *Am Diabetes Assoc*, 2509 (2004).
  22. M Harada, Y Qin, H Takano, *et al.*, G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes, *Nature Medicine*, **11**, 305 (2005).
  23. H Park, J Shin, C Kim, Proteome of mesenchymal stem cells, *Proteomics*, **7**, 2881 (2007).
  24. P Nelson, D Kondziolka, L Wechsler, *et al.*, Clonal human(hNT) neuron grafts for stroke therapy neuropathology in a patient 27 months after implantation, *ASIP*, 1201 (2002).
  25. G Horrocks, L Lauder, R Stewart, *et al.*, Formation of neurospheres from human embryonal carcinoma stem cells, *Biochem Biophys Res Comm*, **304**, 411 (2003).
  26. K Hara, T Yasuhara, M Maki, *et al.*, Neural progenitor NT2N cell lines from teratocarcinoma for transplantation therapy in stroke, *Progress in Neurobiology*, **85**, 318 (2008).
  27. S Pleasure, C Page, V Lee, Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons, *J Neurosci*, **12**, 1802 (1992).
  28. SK Kwon, JJ Song, CG Cho, *et al.*, Regeneration of facial nerve using mesenchymal stem cells in facial nerve palsy animal model, *Tissue Eng Regen Med*, **6(1~3)**, 300 (2009).
  29. AY Oh, SH Kim, CM Kim, *et al.*, The effect of keratin/PLGA scaffold on neural differentiation of rat BMSCs, *Tissue Eng Regen Med*, **6(1~3)**, 112 (2009).
  30. JH Jeong, Adipose stem cells as a clinically available and effective source of adult stem cell therapy, *Int J Stem Cells*, **1(1)**, 43 (2008).
  31. ST Lee, K Chu, HK Park, *et al.*, New concept of neural stem cell transplantation: anti-inflammatory role, *Int J Stem Cells*, **1(1)**, 36 (2008).
  32. KS Lee, SH Yang, SS Jeun, *et al.*, Bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy in stroke, *Tissue Eng Regen Med*, **5(4~6)**, 953 (2008).
  33. G Khang, SH Kim, MS Kim, *et al.*, Recent and future directions of stem cells for the application of regenerative medicine, *Tissue Eng Regen Med*, **4(4)**, 441 (2007).